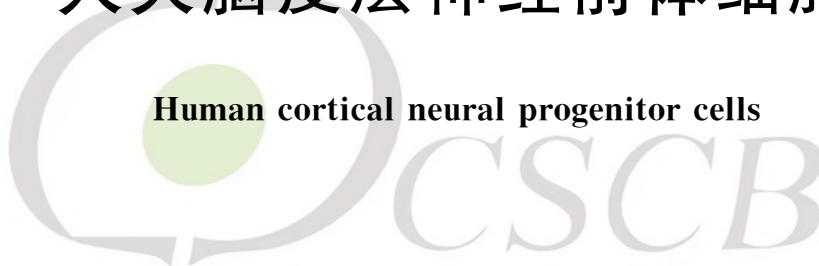


团 体 标 准

T/CSCB 0025—2024

人大脑皮层神经前体细胞

Human cortical neural progenitor cells



中国细胞生物学学会

CHINESE SOCIETY FOR CELL BIOLOGY

2024-10-28 发布

2024-12-31 实施

中国细胞生物学学会 发 布
中国标准出版社 出 版

目 次

前言 III

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 缩略语 1

5 一般要求 2

6 技术要求 2

7 检验方法 3

8 检验规则 4

9 使用说明 5

10 标签 5

11 运输和储存..... 6

附录 A（资料性） 细胞标志蛋白检测 流式细胞仪法 7

附录 B（资料性） 细胞标志蛋白检测 免疫荧光染色法 9

附录 C（资料性） 细胞存活率检测 细胞计数法 11

附录 D（资料性） 神经元分化潜能检测 12

附录 E（资料性） 星形胶质细胞分化潜能检测 14

附录 F（资料性） 分化细胞电生理功能检测 钙成像法 16

附录 G（资料性） B19 检测方法 17

参考文献 18

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国细胞生物学学会标准工作委员会提出。

本文件由中国细胞生物学学会归口。

本文件起草单位：浙江霍德生物工程有限公司、中国科学院动物研究所、北京工商大学、北京泽辉辰星生物科技有限公司、中国科学院广州生物医药与健康研究院、中国食品药品检定研究院、中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心、清华大学、安徽中盛溯源生物科技有限公司、北京大学、北京干细胞与再生医学研究院、苏州大学、浙江大学、复旦大学、中国人民解放军总医院第一医学中心神经外科医学部、中南大学湘雅医院、中国科学技术信息研究所、深圳华大生命科学研究院(国家基因库)、中国医学科学院医学实验动物研究所、中国科学院北京基因组研究所(国家生物信息中心)、复旦大学附属中山医院。

本文件主要起草人：范靖、王安欣、郝捷、赵同标、王昱凯、马爱进、任芳、肖艳双、张愚、潘光锦、纳涛、张可华、陈跃军、姚骏、张颖、赵扬、周毅、赵红玲、胡士军、张宏、田梅、张广柱、杨治权、朱礼军、李启沅、曹佳妮、吴婷婷、魏强、张维绮、李卡、王磊、牛帅帅。



人大脑皮层神经前体细胞

1 范围

本文件规定了人大脑皮层神经前体细胞的一般要求、技术要求、检验方法、检验规则、使用说明、标签以及运输、储存。

本文件适用于人体组织分离的或干细胞分化或转分化获得的人大脑皮层神经前体细胞的检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

WS 213 丙型肝炎诊断

WS 293 艾滋病和艾滋病病毒感染诊断标准

WS 298 甲型病毒性肝炎诊断标准

中华人民共和国药典(2020年版 三部)

全国临床检验操作规程

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

人大脑皮层神经前体细胞 **human cortical neural progenitor cells**

具有有限分裂能力及专能分化为大脑皮层神经元及星形胶质细胞潜能的一种神经前体细胞。

3.2

成瘤性 **tumorigenicity**

细胞接种动物后，在注射部位和(或)转移部位形成(肿)瘤的能力。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

B19:人细小病毒(Human Parvovirus B19)

EBV:人类疱疹病毒(Epstein-Barr Virus)

HAV:甲型肝炎病毒(Hepatitis A Virus)

HBV:乙型肝炎病毒(Hepatitis B Virus)

HCMV:人巨细胞病毒(Human Cytomegalovirus)

hCNPCs:人大脑皮层神经前体细胞(Human Cortical Neural Progenitor Cells)

HCV:丙型肝炎病毒(Hepatitis C Virus)

HIV:人类免疫缺陷病毒(Human Immunodeficiency Virus)

HTLV:人类嗜 T 细胞病毒(Human T-lymphotropic Virus)

STR:短串联重复序列(Short Tandem Repeat)

5 一般要求

5.1 原材料

5.1.1 原材料的获取及其在研究中的使用应符合国内认可的伦理和当地的法律法规。

5.1.2 根据使用目的,细胞研究和生产组织应建立相应的供者评估标准。

5.2 过程和信息管理

5.2.1 应对细胞的原材料获取、制备、检测、运输、储存等过程中影响产品质量的关键因素进行记录,并建立唯一标识,确保能够对过程进行溯源。

5.2.2 应明确记录的最短保留时间,确保记录完整性和记录存储的安全性。

6 技术要求

6.1 细胞形态

单层贴壁生长时形态均一、呈透亮梭形。3D 培养时,可自发形成致密透亮的球体。

6.2 细胞标志蛋白

6.2.1 流式细胞仪法:FOXP3 阳性率应 $\geq 70\%$,PAX6 阳性率应 $\geq 70\%$,NESTIN 阳性率应 $\geq 80\%$,PAX6、NESTIN 双阳性率应 $\geq 60\%$ 。

6.2.2 免疫荧光法:FOXP3,PAX6,NESTIN 均为阳性。

6.3 细胞存活率

未冻存细胞存活率 $\geq 80\%$,冻存复苏后细胞存活率 $\geq 70\%$ 。

6.4 细胞功能指标

6.4.1 经培养后可分化为皮层神经元和星形胶质细胞,人脑皮层神经元标志蛋白 TBR1 及 BRN2 阳性率之和应 $\geq 60\%$,且同时表达神经元标志蛋白 TUJ1 或 MAP2;星形胶质细胞标志蛋白 AQP4 阳性率应 $\geq 5\%$,且同时表达星形胶质细胞标志蛋白 GFAP 或 S100 β 。

6.4.2 细胞电生理功能检测,能检测到电生理活动。

6.5 染色体核型

正常核型应为 46,XX 或 46,XY。

6.6 微生物

真菌、细菌、支原体、HAV、HBV、HCV、HTLV、HIV、EBV、HCMV、B19 应为阴性。

6.7 细菌内毒素

内毒素应 < 5.0 EU/mL。

6.8 STR 鉴别

应符合人标准 STR 图谱,并与供者细胞保持一致,且无杂细胞污染。

6.9 成瘤性

人体组织分离的或干细胞分化或转分化获得的人大脑皮层神经前体细胞检查应为阴性。

7 检验方法

7.1 细胞形态

二维培养条件下以及 3D 培养条件下,用倒置显微镜进行镜下观察。

7.2 细胞标志蛋白

7.2.1 流式细胞仪法

参照附录 A 的方法检验。

7.2.2 免疫荧光染色法

参照附录 B 的方法检验。

7.3 细胞存活率

参照附录 C 的方法检验。

7.4 细胞功能检测

7.4.1 神经元分化潜能

参照附录 D 的方法检验。

7.4.2 星形胶质细胞分化潜能

参照附录 E 的方法检验。

7.4.3 分化细胞电生理功能

参照附录 F 的方法检验。

注:试验中除了能使用附录 F 列出的方法外,也能考虑采用其他具有相似功能的钙指示剂进行替代。此外,也能尝试采用其他经过验证的电生理检测方法,例如多电极阵列检测(MEA, Multielectrode Array Assay)和膜片钳技术等。

7.5 染色体核型检查

按照《中华人民共和国药典(2020 年版 三部)》检验。

7.6 微生物

7.6.1 细菌及真菌

按照《中华人民共和国药典(2020 年版 三部)》中的“1101 无菌检查法”检验。

7.6.2 支原体

按照《中华人民共和国药典(2020 年版 三部)》中的“3301 支原体检查法”检验。

7.6.3 HAV

按照 WS 298 核酸法检验。

7.6.4 HBV

按照《全国临床检验操作规程》核酸法检验。

7.6.5 HCV

按照 WS 213 核酸法检验。

7.6.6 HTLV

按照《全国临床检验操作规程》核酸法检验。

7.6.7 HIV

按照 WS 293 核酸法检验。

7.6.8 EBV

按照《全国临床检验操作规程》核酸法检验。

7.6.9 HCMV

按照《全国临床检验操作规程》核酸法检验。

7.6.10 B19

参照附录 G 的方法检验。

7.7 细菌内毒素

按照《中华人民共和国药典(2020 年版 三部)》中的“1143 细菌内毒素检查法”检测。

7.8 STR 鉴别

可参照 ANSI/ATCC ASN-0002—2022 进行检测。

7.9 成瘤性

按照《中华人民共和国药典(2020 年版 三部)》通则,生物制品生产检定用动物细胞基质制备及质量控制的附录 2:成瘤性检查法检测。

8 检验规则

8.1 抽样方法和数量

8.1.1 在一个生产周期中,同一细胞来源,同一生产线、同一代次、同一方法制备出来的产品为一批。

8.1.2 在同一批的产品中随机抽取 3 个最小包装单元。

8.2 出厂检验

8.2.1 每批产品都进行出厂检验,并出具检验报告。

8.2.2 出厂检验项目应包括第6章规定的所有项目。

8.3 复核检验

根据需要,应由专业细胞检验机构/实验室进行复核检验。

8.4 判定规则

8.4.1 出厂检验项目全部符合第6章规定,判为合格品;有一项及以上不符合本文件规定,则判为不合格品。

8.4.2 复核检验项目全部符合第6章规定,判为合格品;有一项及以上不符合本文件规定,则判为不合格品。

9 使用说明

应至少包括以下内容:

- a) 细胞名称;
- b) 细胞代次;
- c) 细胞数量;
- d) 生产日期;
- e) 生产批号;
- f) 生产组织;
- g) 储存条件;
- h) 运输条件;
- i) 使用方法;
- j) 执行标准号;
- k) 生产地址;
- l) 联系方式;
- m) 邮政编码;
- n) 注意事项。

注:根据用户需求,提供内毒素结果。

10 标签

应至少包括以下内容:

- a) 名称;
- b) 代次;
- c) 数量;
- d) 生产批号;
- e) 生产组织;
- f) 生产日期;
- g) 有效期。

11 运输和储存

11.1 运输

11.1.1 根据细胞的使用要求,选择合适的运输方式和运输条件,保证细胞的生物学特性、安全性、稳定性和有效性。

11.1.2 细胞的运输宜考虑但不限于细胞特性、承载细胞的容器、运输路线、运输条件、运输设备、运输方式、运输风险和保障措施等因素。

11.1.3 运输条件的控制应包括但不限于温度范围、振荡、无污染、设备性能和适当的包装等。

11.1.4 应根据用户要求提供相应的随行检验文件和技术指导文件。

11.1.5 应在必要时检查运输中的包裹,并在可能的情况下添加新的冷冻源(如干冰或液氮)以保持适宜的运输温度。

11.2 储存

11.2.1 应采取优化后的冻存程序和方法以最大限度地减少冻融过程中对细胞的损伤,以确保其正常功能不过多受冻融影响。

11.2.2 应记录细胞的冻存信息,包括但不限于:

- a) 名称;
- b) 批号;
- c) 数量;
- d) 传代次数;
- e) 冷冻日期;
- f) 冻存液成分;
- g) 操作者姓名。

11.2.3 应对细胞储存条件进行记录,包括但不限于:

- a) 储存条件;
- b) 储存日期;
- c) 储存期限;
- d) 储存人员。

附录 A

(资料性)

细胞标志蛋白检测 流式细胞仪法

A.1 仪器和设备

- A.1.1 水平离心机。
- A.1.2 电子天平。
- A.1.3 流式细胞仪。
- A.1.4 医用冷藏箱。

A.2 试剂

- A.2.1 细胞死活染料。
- A.2.2 固定破膜缓冲液。
- A.2.3 人 Fc 受体阻断剂。
- A.2.4 Forkhead box protein G1(FOXP1)及对照抗体。
- A.2.5 Alexa Fluor 488 Mouse anti-Human PAX-6 及对照抗体及二抗。
- A.2.6 PE Mouse anti-NESTIN 及对照抗体。
- A.2.7 SOX2 PE 及对照抗体。
- A.2.8 牛血清白蛋白(BSA)。
- A.2.9 氯化钠注射液。
- A.2.10 正常驴血清(NDS)。
- A.2.11 磷酸盐缓冲液(PBS)。

A.3 测试过程

A.3.1 样本准备

收集单细胞悬液,用水平离心机(A.1.1)300g,离心 5 min,弃上清。用 PBS(A.2.11)或氯化钠注射液(A.2.9)使用水平离心机(A.1.1)清洗细胞 2 次,每次 300g,离心 5 min,弃上清。

A.3.2 细胞染色

用细胞死活染料(A.2.1)和 PBS(A.2.11)按照 1 : 3 的体积比配制成工作液重悬细胞,置于医用冷藏箱(A.1.4)孵育 30 min。孵育结束后,用水平离心机(A.1.1)300g,离心 5 min,弃上清。然后用 BSA(A.2.8)和 PBS(A.2.11)配制成工作液重悬细胞,用水平离心机(A.1.1)300g,离心 5 min,弃上清。

A.3.3 固定破膜

按照说明书将步骤 A.3.2 的样本进行固定破膜,然后平分至 7 份。

A.3.4 封闭

按照人 Fc 受体阻断剂(A.2.3)和正常驴血清(A.2.10)说明书分别封闭 5 份和 2 份样本,该 2 份样本后续染色 FOXP1 和对照抗体组及二抗。

A.3.5 抗体染色

按照说明书建议的抗体稀释比例稀释对应抗体(A.2.4、A.2.5、A.2.6、A.2.7),然后分别重悬上述 7 份样本于医用冷藏箱(A.1.4)中进行抗体孵育。抗体孵育结束后,用固定破膜缓冲液(A.2.2)中的破膜液清洗细胞 1 次,使用水平离心机(A.1.1)500g,离心 5 min,弃上清。

A.3.6 上机检测

用 PBS 重悬样本,按照流式细胞仪(A.1.3)应用手册上机检测。

A.3.7 圈门原则

首先在前向角散射光和侧向角散射光散点图圈出目标细胞分群,排除细胞碎片,然后根据 APC 通道圈出活细胞群,排除死细胞,最后根据阴性对照组荧光强度划定阳性界限,并在活细胞群的基础上圈出阳性细胞群。

A.4 结果分析

得到的检测结果用软件综合分析,具体参考其软件使用说明。



附录 B

(资料性)

细胞标志蛋白检测 免疫荧光染色法

B.1 仪器和设备

倒置荧光显微镜。

B.2 试剂

B.2.1 磷酸盐缓冲液(PBS):pH 7.4。

B.2.2 一抗:Rabbit anti-human PAX6;Mouse anti-human NESTIN;Rabbit anti-human FOXG1。

B.2.3 二抗:Alexa 488 Donkey anti-Rabbit;Alexa 546 Donkey anti-Mouse。

B.2.4 4% 多聚甲醛(PFA)。

B.2.5 超低内毒素蒸馏水;细胞培养级。

B.2.6 聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100)。

B.2.7 含细胞核染料(DAPI)抗荧光淬灭封片剂。

B.2.8 正常驴血清(NDS)。

B.3 检测步骤

B.3.1 样品准备和固定

将细胞悬液接种在基质胶处理的细胞玻片(可选用 48 孔板适用的圆形细胞玻片)上贴壁培养 4 d。4% 多聚甲醛(B.2.4)室温固定细胞 30 min,磷酸盐缓冲液(B.2.1)清洗 3 次,每次 3 min~5 min;同时采用同遗传背景的 iPSCs 作为阴性对照。

B.3.2 封闭和通透

使用含 0.25% Triton X-100(B.2.6)和 3% 正常驴血清(B.2.8)的磷酸盐缓冲液(B.2.1),室温下封闭、通透 30 min。

B.3.3 抗体孵育

用抗体稀释液[含 0.1% Triton X-100(B.2.6)和 1% 正常驴血清(B.2.8)的磷酸盐缓冲液(B.2.1)]按照抗体说明书进行 Rabbit anti-human PAX6(B.2.2)+Mouse anti-human NESTIN(B.2.2),Rabbit anti-human FOXG1(B.2.2)+Mouse anti-human NESTIN(B.2.2)一抗工作液的配制。使用配制的抗体工作液进行抗体孵育,孵育结束后,磷酸盐缓冲液(B.2.1)清洗 3 次。

用抗体稀释液按照抗体说明书,进行二抗工作液(B.2.3)的配制。使用配制的抗体工作液进行抗体孵育,孵育结束后,磷酸盐缓冲液(B.2.1)清洗 3 次。

B.3.4 染核、封片

在载玻片上滴加约 20 μ L 含 DAPI 的防淬灭封片剂(B.2.7)进行染核,将含细胞的盖玻片盖于滴有含 DAPI 的防淬灭封片剂(B.2.7)载玻片上,避免产生气泡,使盖玻片与载玻片贴合。

B.3.5 拍照

根据阴性样本的信号强度调整荧光通道曝光时间,使用倒置荧光显微镜(B.1)20 倍镜下随机取至

少 3 个不同视野成像。

B.4 结果分析

阳性判断依据:细胞核呈圆形或椭圆形蓝色荧光信号;NESTIN 亚细胞定位为细胞质,呈荧光信号围绕在蓝色圆形或椭圆形蓝色信号周围;FOXG1、PAX6 亚细胞定位为细胞核,呈圆形或椭圆形信号与蓝色信号重叠,即判断为阳性。

阴性判断依据:细胞核染色呈圆形或椭圆形蓝色荧光信号;无其他荧光信号,即判断为阴性。

无效信号判断依据:1)细胞核无圆形或椭圆形蓝色信号;2)NESTIN 荧光信号并未围绕在蓝色圆形或椭圆形信号周围或 FOXG1、PAX6 信号并未与蓝色圆形或椭圆形信号重叠。上述任何一种情况出现,均判定为试验无效,需重新开展试验。



附录 C

(资料性)

细胞存活率检测 细胞计数法

C.1 仪器和设备

细胞计数仪。

C.2 试剂

C.2.1 杜氏磷酸盐缓冲液(DPBS)。

C.2.2 0.2%台盼蓝染液。

C.3 测试过程

C.3.1 细胞悬液制备

用DPBS(C.2.1)将待测细胞稀释至合适的浓度。

C.3.2 细胞染色

将上述稀释后的细胞悬液与0.2%台盼蓝染液(C.2.2)按1:1的体积比混合均匀。

C.3.3 细胞计数

按照细胞计数仪(C.1)仪器说明进行测试,每个样品平行测定3次。

C.4 结果分析

三次独立测定的 $RSD \leq 15\%$ 。

附 录 D
(资料性)
神经元分化潜能检测

D.1 仪器和设备

- D.1.1 CO₂ 培养箱。
- D.1.2 冰冻切片机。
- D.1.3 倒置荧光显微镜。

D.2 试剂

D.2.1 分化试剂

- D.2.1.1 神经细胞培养基:含有 1× B-27(去除维生素 A)及 1 mmol/L GlutaMAX 的 Neurobasal 培养基。
- D.2.1.2 Y-27632 2HCl (ROCKi)。

D.2.2 检测试剂

- D.2.2.1 磷酸盐缓冲液(PBS):pH 7.4。
- D.2.2.2 一抗:Mouse anti-Human MAP2; Mouse anti-Human TUJ1; Rabbit anti-Human TBR1 和 Goat anti-Human BRN2。
- D.2.2.3 二抗:Alexa 546 Donkey anti-Mouse; Alexa 488 Donkey anti-Rabbit; Alexa 488 Donkey anti-Goat。
- D.2.2.4 4% 多聚甲醛(PFA)。
- D.2.2.5 超低内毒素蒸馏水:细胞培养级。
- D.2.2.6 聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100)。
- D.2.2.7 含细胞核染料(DAPI)抗荧光淬灭封片剂。
- D.2.2.8 正常驴血清(NDS)。
- D.2.2.9 蔗糖:纯度≥98%。
- D.2.2.10 冰冻切片包埋剂。

D.3 检测步骤

D.3.1 细胞复苏

- D.3.1.1 配制含有 10 μmol/L ROCKi(D.2.1.2)的神经细胞培养基(D.2.1.1)。
- D.3.1.2 细胞化冻,用预热的含 ROCKi 的神经细胞培养基(D.2.1.1)重悬,300g,3 min 离心,弃上清。
- D.3.1.3 用食指轻弹使细胞团块松散,然后含有 10 μmol/L ROCKi(D.2.1.2)的神经细胞培养基(D.2.1.1)重悬并吹散。
- D.3.1.4 细胞计数后用于 3D Brain Organoids 接种。

D.3.2 3D Brain Organoids 细胞样品接种和培养

- D.3.2.1 用含有 10 μmol/L ROCKi(D.2.1.2)的神经细胞培养基(D.2.1.1)调整至细胞浓度为 2.0×10^5 cells/mL,按照 4.0×10^4 cells 每孔接种至超低附圆底 96 孔细胞培养板中。

D.3.2.2 37 ℃、5% CO₂ 培养箱(D.1.1)中培养。

D.3.2.3 Day01-Day28 根据细胞消耗培养基情况每周换液 1 次~2 次,28 d 后每周换液两次,每次培养时长在 30 d~120 d 之间。

D.3.3 检测步骤

D.3.3.1 样品固定、脱水和切片

供试品经 3D 分化培养后,4% 多聚甲醛(D.2.2.4)室温固定 Organoids 30 min,磷酸盐缓冲液(D.2.2.1)清洗 3 次,每次 3 min~5 min。将 Organoids 转移至蔗糖溶液(D.2.2.9)中直至样品沉入溶液底部。将 Organoid 使用冰冻切片包埋剂(D.2.2.10)包埋后使用冰冻切片机(D.1.2)进行冰冻切片;同时采用同遗传背景的 iPSCs 作为阴性对照。

D.3.3.2 封闭和通透

使用含 0.25% Triton X-100(D.2.2.6)和 5% 正常驴血清(D.2.2.8)的磷酸盐缓冲液(D.2.2.1),室温下封闭、通透 60 min。

D.3.3.3 抗体孵育

用抗体稀释液[含 0.1% Triton X-100(D.2.2.6)、3% 正常驴血清(D.2.2.8)的磷酸盐缓冲液(D.2.2.1)]按照抗体说明书稀释抗体,进行 Mouse anti Human-MAP2(D.2.2.2)/Mouse anti Human-TUJ1(D.2.2.2)+Rabbit anti Human-TBR1(D.2.2.2)/Goat anti Human-BRN2(D.2.2.2)一抗工作液的配制。使用配制的抗体工作液进行抗体孵育,孵育结束后,磷酸盐缓冲液(D.2.2.1)清洗 3 次。

用抗体稀释液按照抗体说明书进行二抗工作液(D.2.2.3)的配制。使用配制的抗体工作液进行抗体孵育,孵育结束后,弃上清,磷酸盐缓冲液(D.2.2.1)清洗 3 次。

D.3.3.4 染核、封片

在有 Organoids 冰冻切片的区域上滴加约 20 μL 含 DAPI 的防淬灭封片剂(D.2.2.7)进行染核,避免产生气泡,使盖玻片与载玻片贴合。

D.3.3.5 拍照

根据阴性样本的信号强度调整荧光通道曝光时间,使用倒置荧光显微镜(D.1.3)对整个 Organoids 进行完整切片的成像。

D.4 结果分析

阳性判断依据:细胞核呈圆形或椭圆形蓝色荧光信号;TUJ1 和 MAP2 亚细胞定位为胞体和突起,呈线状荧光信号围绕在蓝色圆形或椭圆形蓝色信号周围;BRN2 和 TBR1 亚细胞定位为细胞核,呈圆形或椭圆形信号与蓝色信号重叠,即判断为阳性。

阴性判断依据:细胞核染色呈圆形或椭圆形蓝色荧光信号;无其他荧光信号,即判断为阴性。

无效信号判断依据:1)细胞核无圆形或椭圆形蓝色信号;2)TUJ1 和 MAP2 荧光信号并未围绕在蓝色圆形或椭圆形信号周围或 BRN2 和 TBR1 信号并未与蓝色圆形或椭圆形信号重叠。上述任何一种情况出现,均判定为试验无效,需重新开展试验。

附录 E

(资料性)

星形胶质细胞分化潜能检测

E.1 仪器和设备

E.1.1 CO₂ 培养箱。

E.1.2 冰冻切片机。

E.1.3 倒置荧光显微镜。

E.2 试剂

E.2.1 分化试剂

E.2.1.1 神经细胞培养基:含有 1X B-27(去除维生素 A)及 1 mmol/L GlutaMAX 的 Neurobasal 培养基。

E.2.1.2 Y-27632 2HCl (ROCKi)。

E.2.2 检测试剂

E.2.2.1 磷酸盐缓冲液(PBS):pH 7.4。

E.2.2.2 一抗:Rabbit anti-Human GFAP;Rabbit anti-Human S100 β ;Rabbit anti-Human AQP4。

E.2.2.3 二抗:Alexa 488 Donkey anti-Rabbit。

E.2.2.4 4% 多聚甲醛(PFA)。

E.2.2.5 超低内毒素蒸馏水:细胞培养级。

E.2.2.6 聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100)。

E.2.2.7 含细胞核染料(DAPI)抗荧光淬灭封片剂。

E.2.2.8 正常驴血清(NDS)。

E.2.2.9 蔗糖:纯度 $\geq 98\%$ 。

E.2.2.10 冰冻切片包埋剂。

E.3 检测步骤

E.3.1 细胞复苏

E.3.1.1 配制含有 10 μ mol/L ROCKi(E.2.1.2)的神经细胞培养基(E.2.1.1)。

E.3.1.2 细胞化冻,用预热的含 ROCKi 的神经细胞培养基(E.2.1.1)重悬,300g,离心 3 min,弃上清。

E.3.1.3 用食指轻弹使细胞团块松散,然后含有 10 μ mol/L ROCKi(E.2.1.2)的神经细胞培养基(E.2.1.1)重悬并吹散。

E.3.1.4 细胞计数后用于 3D Brain Organoids 接种。

E.3.2 3D Brain Organoids 细胞样品接种和培养

E.3.2.1 用含有 10 μ mol/L ROCKi(E.2.1.2)的神经细胞培养基(E.2.1.1)调整至细胞浓度为 2.0×10^5 cells/mL,按照 4.0×10^4 cells 每孔接种至超低附圆底 96 孔细胞培养板中。

E.3.2.2 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱(E.1.1)中培养。

E.3.2.3 Day01-Day28 根据细胞消耗培养基情况每周换液 1 次~2 次,28 d 后每周换液两次,每次培养

时长在 30 d~120 d 之间。

E.3.3 检测步骤

E.3.3.1 样品固定、脱水和切片

供试品经 3D 分化培养后,4% 多聚甲醛(E.2.2.4)室温固定 Organoids 30 min,磷酸盐缓冲液(E.2.2.1)清洗 3 次,每次 3 min~5 min。将 Organoids 转移至蔗糖溶液(E.2.2.9)中直至样品沉入溶液底部。将 Organoid 使用冰冻切片包埋剂(E.2.2.10)包埋后使用冰冻切片机(E.1.2)进行冰冻切片;同时采用同遗传背景的 iPSCs 作为阴性对照。

E.3.3.2 封闭和通透

使用含 0.25% Triton X-100(E.2.2.6)和 5% 正常驴血清(E.2.2.8)的磷酸盐缓冲液(E.2.2.1),室温下封闭、通透 60 min。

E.3.3.3 抗体孵育

用抗体稀释液[含 0.1% Triton X-100(E.2.2.6)、3% 正常驴血清(E.2.2.8)的磷酸盐缓冲液(E.2.2.1)]按照抗体说明书稀释抗体,进行一抗工作液(E.2.2.2)的配制。使用配制的抗体工作液进行抗体孵育,孵育结束后,磷酸盐缓冲液(E.2.2.1)清洗 3 次。

用抗体稀释液按照抗体说明书进行二抗工作液(E.2.2.3)的配制。使用配制的抗体工作液进行抗体孵育,孵育结束后,弃上清,磷酸盐缓冲液(E.2.2.1)清洗 3 次。

E.3.3.4 染核、封片

在有 Organoids 冰冻切片的区域上滴加约 20 μ L 含 DAPI 的防淬灭封片剂(E.2.2.7)进行染核,避免产生气泡,使盖玻片与载玻片贴合。

E.3.3.5 拍照

根据阴性样本的信号强度调整荧光通道曝光时间,使用倒置荧光显微镜(E.1.3)对整个 Organoids 进行完整切片的成像。

E.4 结果分析

阳性判断依据:细胞核呈圆形或椭圆形蓝色荧光信号; AQP4、GFAP 和 S100 β 亚细胞定位为胞体和突起,呈线状荧光信号围绕在蓝色圆形或椭圆形蓝色信号周围,即判断为阳性。

阴性判断依据:细胞核染色呈圆形或椭圆形蓝色荧光信号;无其他荧光信号,即判断为阴性。

无效信号判断依据:1)细胞核无圆形或椭圆形蓝色信号;2) AQP4、GFAP 和 S100 β 荧光信号并未围绕在蓝色圆形或椭圆形信号周围。上述任何一种情况出现,均判定为试验无效,需重新开展试验。

附录 F

(资料性)

分化细胞电生理功能检测 钙成像法

F.1 仪器和设备

F.1.1 CO₂ 培养箱。

F.1.2 倒置荧光显微镜。

F.2 关键试剂

F.2.1 神经细胞培养基:含有 1X B-27(去除维生素 A)及 1 mmol/L GlutaMAX 的 Neurobasal 培养基。

F.2.2 Fluo-4, AM。

F.2.3 二甲基亚砜(DMSO)。

F.2.4 Hanks'平衡盐溶液(HBSS)。

F.3 检测步骤

F.3.1 样本准备:将细胞悬液接种至玻片或玻璃底的细胞培养皿中,使用神经细胞培养基(F.2.1)进行 2D 贴壁分化培养至 14 d 以上;或将细胞悬液接种至低附细胞培养板中进行 3D Brain Organoids 悬浮分化培养至 14 d 以上。

F.3.2 Fluo-4, AM 储存液的配制:使用 DMSO(F.2.3)溶解 Fluo-4, AM(F.2.2),配制成 1 mmol/L 的储存液。

F.3.3 Fluo-4, AM 工作液的配制:使用 HBSS(F.2.4)将 1 mmol/L Fluo-4, AM(F.2.2)的储存液稀释成 1 μmol/L~5 μmol/L 的工作液。

F.3.4 取出分化好待检测的样品,除去培养基,使用 HBSS 溶液(F.2.4)清洗细胞 3 次,加入可覆盖细胞或类脑器官的 Fluo-4, AM 工作液。

F.3.5 在 37 °C 的 CO₂ 培养箱(F.1.1)中孵育 15 min~60 min 后去除 Fluo-4, AM 工作液,用 HEPE 缓冲液(F.2.4)清洗细胞或类脑器官 3 次。

F.3.6 加入 HBSS 溶液(F.2.4),在 37 °C 的 CO₂ 培养箱(F.1.1)中继续孵育细胞或类脑器官 30 min~40 min。

F.3.7 通过倒置荧光显微镜(F.1.2)或其他设备记录细胞荧光信号,在激发波长 494 nm,发射波长 516 nm 下,持续拍摄 5 min~10 min 视频记录细胞或 3D Brain Organoids 的钙信号。

F.4 结果分析

使用图片或视频荧光强度分析软件(如 ImageJ)统计分析视频中细胞的荧光强度变化并绘制成曲线图,若在 1 min 内可观测到至少一个显著的荧光信号峰,则判断分化的细胞或类脑组织具有生理功能。

附 录 G
(资料性)
B19 检测方法

G.1 仪器和设备

qPCR 仪。

G.2 试剂

G.2.1 病毒提取试剂盒。

G.2.2 探针预混液。

G.2.3 引物。

G.2.4 探针。

G.2.5 阳性质粒对照品。

G.3 测试过程

G.3.1 样本准备

细胞上清:无需前处理,直接取样品进行核酸提取。

细胞悬液:取 1 mL 细胞悬液,进行细胞破碎、离心后取上清进行核酸提取。

G.3.2 样品核算提取

采用病毒提取试剂盒(G.2.1)进行样品核酸提取。

G.3.3 样品检验

将探针预混液(G.2.2)与引物(G.2.3)、探针(G.2.4)和模板加到八联排管中,进行 qPCR 检测,同时设置阳性对照(G.2.5)。

G.4 结果分析

试验有效性判定:若样品的 C_p 值 $<$ 检测限,且有典型扩增曲线,则判断为阳性;反之为阴性。

参 考 文 献

- [1] ANSI/ATCC ASN-0002—2022 Authentication of Human Cell Lines: Standardization of Short Tandem Repeat (STR) Profiling
-





中国细胞生物学学会

CHINESE SOCIETY FOR CELL BIOLOGY